

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/064016 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68 // G01N 33/48, C12N 15/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019340
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2003-435943  
2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): プリマハム株式会社 (PRIMA MEAT PACKERS, LTD.) [JP/JP]; 〒1408529 東京都品川区東大井三丁目 17 番 4 号 Tokyo (JP). 独立行政法人食品総合研究所 (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒3058642 茨城県つくば市観音台 2-1-12 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀越 菜穂子 (HORIKOSHI, Naoko) [JP/JP]; 〒3000841 茨城県土浦市中向原 635 番地 プリマハム株式会社内 Ibaraki (JP). 川崎 晋 (KAWASAKI, Susumu) [JP/JP]; 〒3058642 茨城県つくば市観音台 2-1-12 独立行政法人食品総合研究所内 Ibaraki (JP). 岡田 幸男 (OKADA, Yukio) [JP/JP]; 〒3000841 茨城県土浦市中向原 635 番地 プリマハム株式会社内 Ibaraki (JP).

竹下 和子 (TAKESHITA, Kazuko) [JP/JP]; 〒3000841 茨城県土浦市中向原 635 番地 プリマハム株式会社内 Ibaraki (JP). 鮫島 隆 (SAMESHIMA, Takashi) [JP/JP]; 〒3000841 茨城県土浦市中向原 635 番地 プリマハム株式会社内 Ibaraki (JP). 川本 伸一 (KAWAMOTO, Shinichi) [JP/JP]; 〒3058642 茨城県つくば市観音台 2-1-12 独立行政法人食品総合研究所内 Ibaraki (JP). 一色 賢司 (ISSHIKI, Kenji) [JP/JP]; 〒3058642 茨城県つくば市観音台 2-1-12 独立行政法人食品総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF MULTIPLEX MICROORGANISM DETECTION

(54) 発明の名称: 微生物の多重検出方法

(57) Abstract: It is intended to provide a multiplex detection method whereby contaminating microorganisms in foods (for example, pathogenic *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and salmonellas) can be detected at a high sensitivity comparable or even superior to an official method, which comprises amplifying a plural number of target genes in a single PCR tube and analyzing the same. The following procedures are successively performed: (A) the step of treating a lytic enzyme such as achromopeptidase or lysozyme and/or a bacteriocin having a lytic activity such as enterolysin with a surfactant and a protein-denaturing agent to thereby extract DNAs of target microorganisms to be detected; and (B) the step of mixing primers specific to the target microorganisms to be detected and carrying out multiplex PCR. It is favorable to employ the step of culturing the microorganisms under such culture conditions as allowing the proliferation of 1 CFU/100 g of the microorganisms before the culture to achieve a level of 10<sup>3</sup> CFU/ml or more after culturing for 18 to 48 hours (for example, under such conditions as giving a pH value of 5.1 or higher after the completion of the culture), before the step (A) of extracting the DNAs of the target microorganisms to be detected.

(57) 要約: 食品に存在する病原性大腸菌 O157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の汚染微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで、公定法と同等又はそれ以上の高い感度で検出することができる微生物の多重検出方法を提供するものである。(A) 少なくとも、アクロモペプチダーゼ、リゾチーム等の溶菌酵素及び/又はエンテロリシン等の溶菌活性を持つバクテリオシンと界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物のDNAを抽出する工程と、(B) 検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工程を順次行う。また、上記(A)の検出対象微生物のDNAを抽出する工程の前に、1CFU/100gの微生物が18~48時間培養後に10<sup>3</sup>CFU/ml以上となる培養条件下、例えば培養後のpHが5.1以上となる培養条件下で培養する工程を設けることが好ましい。

WO 2005/064016 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。